



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

LUCIELLEN SILVEIRA DOS SANTOS

**DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM AMOSTRAS DE QUEIJO POR TITULAÇÃO DE
COMPLEXAÇÃO APÓS SOLUBILIZAÇÃO DA AMOSTRA COM HIDRÓXIDO DE
TETRAMETILAMÔNIO: ALTERNATIVA PARA MÉTODO PADRÃO**

LARANJEIRAS DO SUL

2015

LUCIELLEN SILVEIRA DOS SANTOS

**DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM AMOSTRAS DE QUEIJO POR TITULAÇÃO DE
COMPLEXAÇÃO APÓS SOLUBILIZAÇÃO DA AMOSTRA COM HIDRÓXIDO DE
TETRAMETILAMÔNIO: ALTERNATIVA PARA MÉTODO PADRÃO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau de
bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade
Federal da Fronteira Sul

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tormen

LARANJEIRAS DO SUL

2015

LUCIELLEN SILVEIRA DOS SANTOS

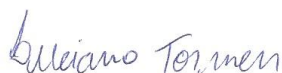
**DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM AMOSTRAS DE QUEIJO POR
TITULAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO APÓS SOLUBILIZAÇÃO COM
HIDRÓXIDO DE TETRAMETILAMÔNIO: ALTERNATIVA PARA O
MÉTODO PADRÃO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Laranjeiras do Sul-PR.

Orientador: Professor Dr. Luciano Tormen

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 14 / 12 / 2015

BANCA EXAMINADORA



Prof. Luciano Tormen



Prof. Larissa Canhadas Bertan



Prof. Thiago Bergler Bitencourt

Dedico este trabalho a minha família, a meus amigos e para todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha mãe Leonilda, meu pai Valdeci e minha irmã Laudicéia pelo incondicional apoio durante toda essa jornada, me incentivando a sempre seguir em frente.

Aos meus amigos, pelo imenso apoio e incentivo e por serem minha segunda família.

As minhas colegas, principalmente as que me fizeram companhia no laboratório, vocês tornaram os experimentos muito mais divertidos.

Aos meus professores, que sempre me auxiliaram permitindo o bom andamento do meu trabalho e também meu crescimento pessoal.

A meu orientador Luciano Tormen, pelos conhecimentos transmitidos, pela dedicação, pela oportunidade que me foi dada e principalmente pela paciência durante todo o trabalho.

Esperança e superação.

Essas sempre deveriam ser as palavras chaves da vida de todo ser humano.

Acredite sempre no impossível, creia... é possível.

Nunca diga nunca, siga mantendo as esperanças, porque dizem que a esperança é a última que morre, mas jamais falaram em reencarnação para ela, portanto se a sua morrer, espere o que for preciso para que ela reencarne e só assim você chegará à famosa superação e em consequência, a glória!

E o mais importante, não permita que ninguém atrase seus sonhos com palavras negativas, pois é possível, basta acreditar!(Silva, C.)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico para determinação de cálcio por volumetria de complexação em amostras de diversos tipos de queijo solubilizadas com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH). Foi avaliado o processo de solubilização de amostras por TMAH em relação ao tempo de incubação a 90°C com as proporções de 1:5:5 (m/v/v) de amostra, TMAH e água respectivamente, também foi avaliada a influência do TMAH e do pH na reação de complexação. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de cálcio em amostras de queijo mussarela, minas, gorgonzola e colonial e comparados com a metodologia padrão de preparo de amostras, que é a digestão ácida. Foi observado que o tempo necessário de solubilização das amostras é de 60 min e que TMAH não influencia na reação de complexação. Após a solubilização das amostras foi necessário acidificar até pH 2 - 3 a mistura (amostra/TMAH) para evitar a precipitação do cálcio sob a forma de hidróxido ou carbonato, desta maneira por testes de adição e recuperação foram obtidas recuperações médias de 99%, indicando que o método é livre de interferências. Na aplicação do método na análise das amostras foi obtido uma recuperação de em média 89%, quando comparado com o método padrão de preparo de amostras (digestão ácida). O limite de detecção foi de 240 e 180 mg kg⁻¹ para o método proposto e método padrão, respectivamente, e o desvio padrão relativo foi de 3,5 e 2,7% para o método proposto e método padrão, respectivamente. Estes resultados são satisfatórios, pois nos permitem determinar cálcio neste tipo de amostra com precisão e em baixas concentrações, além de que o preparo de amostras com TMAH é possível e eficiente, sendo mais rápido, de menor custo e por gerar menor quantidade de resíduos quando comparado a digestão ácida.

Palavras - chaves: TMAH. Volumetria de Complexação. Cálcio. Queijo

ABSTRACT

The objective of this study was to develop a method for calcium determination by volumetric complexation in sample of many types of cheese solubilized with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). Was evaluated the solubilization of samples with TMAH in relation to the incubation time at 90 °C with the ratios 1: 5: 5 (m/v/v) sample, TMAH and water respectively, was also evaluated the influence of pH and TMAH in the complexation reaction. The proposed method was applied to the determination of calcium in mozzarella cheese samples, mines, gorgonzola and colonial and compared with the standard methodology of sample preparation, which is the acid digestion. It was observed that the time required the solubilization of the samples was 60 min and TMAH that does not affect the complexing reaction. After solubilization of the samples was necessary to acidify to pH 2 - 3 the sample solution (sample / TMAH) to avoid precipitation of the calcium in the hydroxide or carbonate form. With this procedure the addition and recovery test give are covery average of 99%, indicating that this method is interference free. The method application in the sample analysis was obtained a recovery averaged of 89%, compared to the standard method of sample preparation (acid digestion). The detection limit was 240 and 180 mg kg⁻¹ for the proposed method and standard method, respectively, and the relative standard deviation was 3.5 and 2.7% for the standard method and the proposed method, respectively. These results are satisfactory, it allowing the calcium determination in this sample accurately and at low concentrations. That the samples preparation method with TMAH is possible and efficient, and faster, lower cost and generate less waste when compared to acid digestion.

Keywords: TMAH. Volumetric Complexation. Calcium. Cheese

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Composição de cálcio em diversos alimentos | 19 |
| Tabela 2: Massa de cálcio recuperada na solubilização da amostra de queijo mussarela em relação ao tempo de incubação | 34 |
| Tabela 3:Avaliação da recuperação cálcio em soluções com diferentes concentrações de TMAH..... | 36 |
| Tabela 4: Recuperação de cálcio adicionado sobre um volume fixo de amostra solubilizada com TMAH..... | 37 |
| Tabela 5: Recuperação de cálcio adicionado (0,8 mg) sobre diferentes volumes de amostra solubilizada com TMAH..... | 38 |
| Tabela 6:Massa de cálcio recuperada em relação aos diferentes tempos e diferentes pH..... | 41 |
| Tabela 7: Recuperação de cálcio adicionado sobre um mesmo volume fixo de amostra solubilizada com TMAH e pH ajustado entre 2-3 | 42 |
| Tabela 8: Concentração de cálcio em diferentes amostras de queijo (mg de cálcio por Kg de amostra) obtidos pela análise após diferentes procedimentos de preparo de amostra | 43 |
| Tabela 9: Figuras de mérito..... | 44 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Micela de Caseína (A: submicela, B: cadeias protéicas, C: fosfato de cálcio, D: k-caseína, E: grupo fosfato) | 18 |
| Figura 2 - Fórmula estrutural do EDTA..... | 26 |
| Figura 3 - pH mínimo necessário para a titulação de diversos íons metálicos com EDTA | 27 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1INTRODUÇÃO | 13 |
| 2OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 16 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 16 |
| 3REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 QUEIJO E IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE EM RELAÇÃO AO TEOR DE CÁLCIO | 17 |
| 3.2 CÁLCIO | 18 |
| 3.3 PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE INORGÂNICA | 19 |
| 3.3.1 Decomposição de amostras por combustão..... | 20 |
| 3.3.2 Decomposição de amostras por via úmida | 21 |
| 3.3.3 Decomposição assistida por micro-ondas..... | 22 |
| 3.3.4 Solubilização de amostras com hidróxido de tetrametilamônio | 23 |
| 3.4 VOLUMETRIA DE COMPLEXAÇÃO..... | 25 |
| 4MATERIAIS E MÉTODOS..... | 29 |
| 4.1 MATERIAIS..... | 29 |
| 4.2 REAGENTES | 29 |
| 4.3METODOLOGIA | 29 |
| 4.3.1Preparo da solução padrão de cálcio 3 g L ⁻¹ | 29 |
| 4.3.2Solução de EDTA 0,01 mol L ⁻¹ 250 mL..... | 29 |
| 4.3.3Método utilizado na determinação da massa de cálcio a partir dos dados volumétricos..... | 30 |
| 4.3.4 Avaliação do tempo na solubilização das amostras | 30 |
| 4.3.5 Influência do TMAH na determinação de Cálcio | 31 |
| 4.3.6 Influência da matriz da amostra na determinação de cálcio..... | 31 |
| 4.3.7 Eliminação de interferências..... | 31 |
| 4.3.8 Aplicação do método desenvolvido comparando com a digestão ácida | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 33 |
| 5.1 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA SOLUBILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS COM TMAH | 33 |
| 5.2 INFLUÊNCIA DO TMAH NA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO | 34 |
| 5.3 INFLUÊNCIA DA MATRIZ DA AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO | 36 |
| 5.4 ELIMINAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS..... | 40 |
| 5.5 APLICAÇÃO MÉTODO PROPOSTO E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO PADRÃO DE PREPARO DE AMOSTRA..... | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 6CONCLUSÃO..... | 45 |
| 7REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 46 |

1 INTRODUÇÃO

A análise inorgânica em amostras de origem biológica constitui um grande problema analítico, pois é necessária a transformação das espécies de interesse em uma forma inorgânica simples. Neste sentido, a decomposição das amostras, promove a liberação dos analitos para a fase aquosa e ficando livres, requisito indispensável para a determinação dos mesmos, seja pelos métodos clássicos de análise ou por métodos instrumentais, embora existam instrumentos capazes de fazer a análise direta de sólidos (KRUG, 2008).

A metodologia a ser utilizada para preparo das amostras depende de uma série de fatores, entre eles a disponibilidade de equipamentos, a natureza da amostra, das características do analito e do tempo disponível para tal tarefa. Geralmente estes procedimentos promovem a oxidação da matriz, sendo os mais comuns a decomposição por combustão, decomposição por via úmida e decomposição assistida por micro-ondas (KRUG, 2008).

A decomposição por combustão é o método em que a amostra é submetida a combustão por oxigênio atmosférico a 450 e 550°C, podendo ocorrer perdas de compostos voláteis. Já a decomposição por via úmida é o aquecimento da amostra utilizando um bloco digestor na presença de um reagente oxidante como ácidos minerais, tendo como vantagem a utilização de temperaturas menores, mas utiliza muitos reagentes, produzindo mais resíduos. E a decomposição assistida por micro-ondas em fornos utilizando radiação de micro-ondas para aquecer e decompor a amostra em uma mistura de reagentes oxidantes. Estes procedimentos fazem o uso excessivo de reagentes e de equipamentos que podem ser de elevado custo, e dependendo do procedimento o processo pode ser muito lento o que compromete a frequência analítica (KRUG, 2008; SKOOG, et al, 2010).

As alternativas os métodos tradicionais de preparo de amostras está no uso de reagentes orgânicos que tem a capacidade de solubilizar as amostras de natureza biológica. Entre estes reagentes está o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), que tem características de base forte. O TMAH tem sido frequentemente utilizado no preparo de amostras biológicas a fim de realizar análise inorgânica por meio de métodos instrumentais e, tem se destacado por permitir o preparo de amostras utilizando uma quantidade relativamente baixa do reagente, de maneira

rápida, fácil, simples e reprodutível sem fazer o uso de equipamentos de alto custo.(NUNES,et al, 2011; SILVA,et al, 2012)

O TMAH é uma base orgânica forte que possui um pH entre 13,4 e 14,7, solúvel em água ou álcoois, possuindo o aspecto de um líquido incolor com forte odor de amina. Os procedimentos que empregam TMAH envolvem a dissolução completa ou parcial da amostra, podendo ser em temperatura ambiente ou entre 60 e 120°C, que são as mais utilizadas. Em temperaturas baixas há a solubilização de biomoléculas ligadas a C-O e em temperaturas mais altas há quebra das ligações C-C, sendo que, para especificar diferentes espécies inorgânicas considera-se também a concentração e o tempo de solubilização (NÓBREGA, et al, 2006).

Entre as metodologias para análise inorgânica, se destacam os métodos instrumentais entre eles a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometrias de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de absorção atômica. Os métodos instrumentais permitem determinar praticamente todos os elementos da tabela periódica com alta precisão e exatidão em níveis de partes por bilhão. Entretanto, estes métodos não estão disponíveis em todos os laboratórios além de apresentarem alto custo e exigem analistas altamente capacitados (SKOOG, et al, 2010)

Antes do desenvolvimento dos métodos instrumentais de análise, as análises químicas eram realizadas por meio dos métodos clássicos (volumetria e gravimetria), entretanto estes métodos são pouco seletivos e apresentam baixa capacidade de detecção para diversos elementos para a análise da maioria das matrizes. Devido a estas dificuldades, os métodos clássicos foram substituídos por métodos instrumentais. Mesmo que os métodos instrumentais tenham se destacado, existem matrizes em que a concentração de algumas espécies é relativamente alta, e assim é possível aplicar os métodos clássicos de análise (SKOOG, et al, 2010)

A volumetria de complexação é um método clássico baseado na formação de complexos. Neste método uma espécie doadora de elétrons (ligante) reage com um íon metálico, espécie que apresenta um orbital vazio capaz de receber elétrons formando um complexo. O ligante mais utilizado é o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) que reage na proporção 1:1 com os íons metálicos, não importando a carga

do íon (VOGEL, 1981). Esta técnica ainda tem sido aplicada na determinação de diversos elementos permitindo obter resultados satisfatórios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico para a determinação de cálcio em queijo por volumetria de complexação após a solubilização das amostras com TMAH.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar parâmetros relacionados à solubilização de amostras de diversos tipos de queijo com TMAH.

Avaliar parâmetros relacionados a titulação complexiométrica de cálcio com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como a influência do TMAH, influência do pH do meio e do comportamento do indicador negro de eriocromo T na presença de TMAH.

Validar o método por meio de testes de adição e recuperação.

Aplicar o método desenvolvido e otimizado na determinação de cálcio em amostras solubilizadas de queijo com TMAH.

Comparar os resultados obtidos através do método proposto com os resultados obtidos na análise das amostras digeridas por via úmida.

Determinar figuras de mérito do método a fim de avaliar a capacidade de detecção e a precisão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 QUEIJO E IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE EM RELAÇÃO AO TEOR DE CÁLCIO

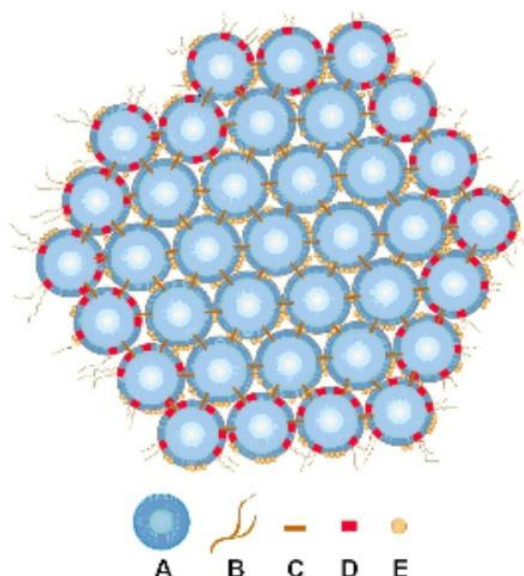
Os primeiros registros que mencionam o leite e o gado bovino aparecem nos escritos dos sumérios (4000 a.C.), dos babilônicos (2000 a.C.). Possivelmente os queijos e leites fermentados tenham surgido acidentalmente ao se armazenar o leite em recipientes feitos com estômagos de ruminantes, assim horas depois ocorria a coagulação e se o soro fosse drenado restava uma massa compacta que poderia ser consumida (ORDONEZ, 2005).

Atualmente o queijo é definido como o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite restituído, ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específica, de ácido orgânico, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem uso de aditivos. Os queijos são classificados de acordo com seu conteúdo de umidade, tipo de coalhada e dos microrganismos que participam da maturação, sendo essa classificação em queijos muito duros (umidade inferior a 25%), duros(umidade de 25 a 36%), semimoles (umidade de 36 a 40%) e moles (umidade superior a 40%) (ORDONEZ, 2005; BRASIL, 1996).

Os queijos representam o principal derivado lácteo, tanto na questão de variedades quanto na questão de produção e consumo. Possui uma importante função nutricional por ser um alimento de alta densidade e por possuir como principais nutrientes proteínas, gorduras e cálcio (PEREIRA, 2014).

A presença do cálcio no queijo influencia nas propriedades funcionais, como de derretimento, filagem e na textura, como a dureza e a elasticidade. A forma de apresentação do cálcio antes, durante e após a fabricação do queijo é determinante nessas características. Ele pode estar presente compondo as proteínas complexas como a micela de caseína que formam a estrutura do queijo ou pode estar difundido na fase aquosa, na forma livre ou associado a íons solúveis (PEREIRA, 2014)

Figura 1 - Micela de Caseína (A: submicela, B: cadeias protéicas, C: fosfato de cálcio, D: k-caseína, E: grupo fosfato)



Fonte: BRASIL, 2013

Um dos fatores que influenciam no equilíbrio das formas de apresentação do cálcio é o pH, pois ele está relacionado na solubilização de fosfato de cálcio coloidal (FCC), nas alterações da carga elétrica sobre a caseína e na hidratação das moléculas de caseína. Os valores do pH durante a coagulação, drenagem, enformagem e durante a maturação podem alterar a concentração do cálcio residual nos queijos (PEREIRA,2014). De acordo com Furtado (2005) apud Pereira (2014), a dissociação do cálcio depende do sal ao qual está associado, mas quanto maior o pH do meio maior é o grau de dissociação do sal do cálcio.

3.2 CÁLCIO

O cálcio é um mineral classificado como metal alcalino terroso, forma um cátion bivalente encontrado em muitos alimentos como leite e derivados, verduras folhosas (couve e agrião) e algumas oleaginosas como amêndoas. Ele é fundamental para funções orgânicas como transmissão nervosa, coagulação do sangue, contração muscular, respiração celular, formação e manutenção de ossos e dentes (DE LA FUENTE, BELLOQUI e JUÁREZ, 2004; COZZOLINO,2010; GROPPER, SMITH,GROFF,2011 apud PEREIRA,2014).

Com isso, é recomendada a ingestão de 1g/dia de cálcio para adultos sendo que essa ingestão deve ser constante para manutenção da concentração

plasmático do cálcio. O cálcio é armazenado no organismo sob a forma de massa óssea, que dependendo das necessidades pode ser liberado para a corrente sanguínea (MARTINI e WOOD,2002;MOTTA,2000 apud PEREIRA,2014)

A absorção do cálcio pelo organismo pode ocorrer de duas maneiras: uma via transcelular também chamada de via ativa saturável, que é mediada pela vitamina D, a qual é responsável pela maior parte da absorção quando os níveis de ingestão são moderados, e uma via paracelular também chamada de passiva não saturável, por meio da difusão simples ou facilitada, cuja absorção é percebida quando a concentração plasmática do cálcio é elevada (PEREIRA,2014).

Os componentes nutricionais como as proteínas e a lactose presentes no leite e derivados, influenciam também na absorção de cálcio. A proteína influencia na absorção por exercer função de proteção frente à eliminação renal do cálcio e a lactose aumenta a solubilidade do cálcio no intestino, estimulando a absorção do mineral por difusão passiva (CORMAN,1993, PEREIRA,et al, 2009 apud PEREIRA,2014).

O leite e derivados são as fontes que mais contém cálcio, o leite de vaca contém aproximadamente $1,20 \text{ g L}^{-1}$, 20% destes está ligado a caseína e 80% na forma de íons livres, nos queijos está imediatamente disponível (COBAYASHI,2004). As concentrações em outros alimentos estão representadas na tabela 1.

Tabela 1: Composição de cálcio em diversos alimentos

| Alimento | Cálcio (mg) / 100g |
|----------------------|---------------------------|
| Sardinha em conserva | 402,00 |
| Brócolis cozido | 113,00 |
| Casca de abacate | 123,94 |
| Casca de banana | 66,71 |
| Casca de tangerina | 478,98 |

Fonte: Cobayashi (2004), Gondim, et al, (2005)

3.3 PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE INORGÂNICA

Na determinação de elementos químicos em amostras de natureza orgânica, existe a necessidade de transformá-los em uma forma inorgânica simples. Esta transformação será realizada dependendo do elemento a ser quantificado, do tipo de

amostra e do método de análise a ser utilizado. Geralmente, a matriz da amostra é oxidada sendo convertida em óxidos de carbono, óxidos de nitrogênio, óxidos de enxofre e água, enquanto que metais e semi metais permanecem em formas inorgânicas simples (íons hidratados) convenientemente para análise (KRUG, 2008).

A maioria das técnicas analíticas foram desenvolvidas para a análise de soluções aquosas, pois as curvas analíticas de calibração podem ser feitas com soluções padrões de fácil preparo, as diluições são fáceis, são homogêneas e a separação de seus constituintes é mais fácil. Tal como nos métodos instrumentais de análise, na volumetria de complexação é imprescindível que a amostra esteja sob a forma líquida e o analito livre para reagir com o agente complexante. Sendo assim, como os queijos são sólidos e o cálcio pode estar associado a macromoléculas é necessário solubilizar o mesmo tornando o cálcio livre sob a forma iônica (KRUG, 2008; VOGEL, 1981).

As técnicas utilizadas no preparo de amostras são: decomposição por combustão, digestão via úmida, digestão assistida por micro-ondas e solubilização com reagentes orgânicos como aminas terciárias e o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH).

3.3.1 Decomposição de amostras por combustão

A decomposição por combustão é o método mais simples para o preparo de amostras biológicas e orgânicas. Este método consiste na combustão da fração orgânica da amostra com o oxigênio atmosférico, obtendo um resíduo inorgânico na forma de cinza solúvel em ácido diluído. O oxigênio atmosférico atua como agente oxidante e o resíduo da queima são óxidos de metais, além de sulfatos não voláteis, fosfatos e silicatos (KRUG, 2008).

O procedimento é conduzido em um forno mufla sendo a temperatura ajustada para que seja suficiente para decompor a amostra em um período de tempo aceitável, sem que ocorra perda do analito na forma de espécies inorgânicas voláteis, esta temperatura é geralmente entre 450 e 550°C. Para não haver perdas por volatilização, a decomposição por via seca em cadinho é aplicável somente para elementos metálicos. Perdas também podem ocorrer pela reação da amostra com o material do cadinho (KRUG, 2008).

As vantagens da decomposição via seca em sistema aberto é a relação entre massa de amostra e volume final ser muito flexível, requerer pouca atenção do analista e solubilização das cinzas em meio compatível com método de análise, uma vez que dependendo das características do analito alguns ácidos são incompatíveis. As desvantagens são as perdas de elementos por volatilização, da amostra como aerossol sólido, da amostra como espuma, alto risco de contaminação, além de que algumas cinzas são de difícil dissolução (KRUG,2008).

Os métodos que podem ser utilizados são a combustão em chama aberta, ou em tubos com oxigênio em um frasco fechado. A combustão em chama aberta ou mineralização a seco consiste em aquecer a amostra em um cadinho aberto a altas temperaturas até que todo o material carbonáceo tenha sido oxidado a dióxido de carbono. Na combustão em tubos, o aquecimento é realizado em um tubo de combustão de vidro ou quartzo, através do qual flui uma corrente de gás que transporta os produtos voláteis para uma parte do equipamento, em que eles são separados e retidos. Na combustão com oxigênio em um frasco fechado, os produtos de reação são absorvidos em um solvente antes do frasco ser aberto (SKOOG, et al , 2010).

3.3.2 Decomposição de amostras por via úmida

A decomposição de amostras por via úmida implica em aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, ou de misturas de ácidos oxidantes, ou misturas de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio. Por meio desta técnica é possível oxidar completamente a maioria das amostras convertendo os elementos em formas inorgânicas simples e apropriadas para análise (KRUG,2008).

Este procedimento de decomposição pode ser aplicado para a determinação de elementos em vários tipos de amostra, sendo que a principal vantagem é a utilização de temperaturas menores, em relação as empregadas na decomposição por combustão. A decomposição pode ser realizada em frascos abertos, onde a temperatura de decomposição é o ponto de ebulição do reagente utilizado, mas também pode ser realizada em frascos fechados (KRUG,2008, SKOOG, et al, 2010).

Os reagentes que podem ser utilizados na decomposição são, o ácido nítrico, o sulfúrico e o perclórico, podendo ser utilizados individualmente, combinados ou

com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), no caso de amostras mais difíceis de serem decompostas. O ácido nítrico possui o ponto de ebulição mais baixo do que os outros ácidos, o que dificulta alcançar temperaturas mais altas a fim de decompor amostras mais complexas. Para alcançar temperaturas maiores do que a de ebulição do ácido é necessário executar os procedimentos em frascos fechados, o que dificulta a execução do procedimento e aumentam os riscos devido a elevada pressão desenvolvida dentro do frasco (KRUG, 2008).

A principal vantagem da decomposição por via úmida é o emprego de temperaturas menores, diminuindo a perda por volatilização. O método mais utilizado é a decomposição com frasco aberto, nesse sistema as características da amostra serão responsáveis pela escolha do ácido ou a mistura ideal. Um método com frasco aberto é o Kjeldahl que é utilizado indiretamente para determinação de proteínas (KRUG, 2008).

Os sistemas fechados são utilizados quando se deseja determinar elementos muito voláteis, como os halogênios (As, B, Hg, P, S, Sn, e Te). As principais vantagens do sistema fechado é a ausência de perda por volatilização, reações com curta duração empregando temperaturas acima da de ebulição do ácido, redução de reagentes e ausência de riscos de contaminação por fontes externas (KRUG, 2008, SKOOG, et al, 2010).

3.3.3 Decomposição assistida por micro-ondas

Os primeiros experimentos que utilizaram radiação micro-ondas para decomposição de amostras foram realizadas em 1975, empregando fornos de micro-ondas domésticos para a decomposição de tecidos vegetais e animais em frascos abertos. Ficou evidente que o tempo de decomposição das amostras diminuiu em relação aos procedimentos convencionais que empregavam chapas ou blocos digestores. Atualmente este procedimento no preparo de amostras inorgânicas quanto orgânicas (KRUG, 2008; SKOOG, et al, 2010).

Os sistemas analíticos desenvolvidos especificamente para decomposições assistidas por micro-ondas apresentam facilidades para medir a temperatura e a pressão do sistema amostra-ácido durante o período reacional. O conhecimento dessas variáveis permite o controle das etapas do processo de decomposição,

possibilitando a determinação experimental da duração e das potências mais adequadas para cada etapa do processo (KRUG, 2008).

A decomposição por micro-ondas pode ser realizada tanto em frasco aberto quanto fechado, sendo que os frascos são mantidos em um suporte que gira continuamente para que recebam aproximadamente a mesma energia. A utilização de frascos fechados é mais frequente por alcançarem pressões e temperaturas mais altas que acelera o processo de decomposição da amostra (SKOOG, et al, 2010).

As vantagens de utilizar frasco fechado é evitar as perdas por evaporação, redução de reagentes, de interferências e contaminação. Outra vantagem é a velocidade da decomposição, pois comparado com os métodos convencionais aplicando chama ou aquecimento por chapa há diferenças nos mecanismos de transferência de calor. Nos métodos convencionais a transferência ocorre por condução e os frascos utilizados são mal condutores aumentando o tempo para aquecer e não mantém toda a solução no ponto de ebulição. Já na decomposição por micro-ondas, a energia é diretamente transferida para todas as moléculas da solução quase simultaneamente sem o aquecimento do frasco (SKOOG, et al, 2010).

3.3.4 Solubilização de amostras com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH)

As metodologias convencionais de preparo de amostras para análise inorgânica envolvem a digestão com ácidos oxidantes e aquecimento, em blocos digestores ou assistida por radiação de micro-ondas. A maior parte desses procedimentos são demorados, requerem equipamentos complexos e aumentam o risco de contaminação e perda de analito por volatilização ou adsorção. Com isso, foram desenvolvidas alternativas simples que evitam esses problemas e que reduzem também o tempo de preparo da amostra, reduzem o número e a quantidade de reagentes (SILVA, et al, 2012).

Uma dessas alternativas é a solubilização das amostras com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), um reagente alcalino forte. O TMAH é uma base orgânica forte possuindo um pH entre 13,4 e 14,7 com fórmula química $(CH_3)_4NOH$, solúvel em água ou álcoois com a propriedade de solubilizar diferentes tipos de tecidos. O reagente é um líquido incolor com um forte odor de amina, completamente solúvel em água e estáveis em temperatura ambiente, podendo promover a cisão hidrolítica

e a metilação de estéres, amidas e de algumas ligações éter, além da quebra de ligações químicas dissulfeto nas proteínas nas temperatura entre 250 e 300°C (SAVIO,et al, 2014; WU, et al, 2012; NUNES,et al, 2011; NÓBREGA, et al, 2006).

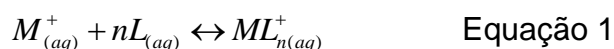
Os procedimentos que empregam TMAH envolvem uma dissolução completa ou parcial da amostra, sendo que diferentes proporções de amostra/TMAH tem sido utilizadas. As temperaturas que têm sido empregadas é a temperatura ambiente e entre 60 e 120°C, em temperaturas suficientemente baixas podem ser solubilizadas biomoléculas ligadas a C-O e em temperaturas altas há quebra das ligações C-C. Com isso, as amostras biológicas podem ser facilmente solubilizadas à temperatura ambiente com o TMAH, não exigindo a utilização de energia, tais como micro-ondas, ultra-sons ou placas quentes para aquecimento, além de pequenas quantidades de solução ser necessárias para a solubilização completa das amostras, resultando em volumes de diluição menores. O uso do TMAH resulta em um método com o mínimo de manuseamento e consumo de tempo, reduzindo a perda de amostra e a contaminação, fácil aplicabilidade e reproduzível para preparar as amostras a serem analisadas (NUNES,et al, 2011; SILVA,et al, 2012; NÓBREGA, et al, 2006).

A redução do tempo de dissolução utilizando TMAH é apropriada para especificar diferentes espécies inorgânicas, pois o reagente, a concentração e o tempo de solubilização dependem do tipo de amostra. A utilização de TMAH foi proposta em 1973 para digestão de tecidos animais. De acordo com Nóbrega, et al, (2006) e Pereira (2011) há registros de aplicações de TMAH na solubilização de amostras biológicas como fígado de rato e em biópsias de músculos humanos. Também há procedimentos empregando solubilização alcalina em carnes de pescado com reagentes como misturas de aminas terciárias solúveis em água, pesquisadores utilizaram 1,2 mL de TMAH 25% (m/m) na solubilização de 300mg de amostras de peixe, a mistura foi digerida em recipientes fechados e mantida a 60°C em banho-maria por 10 min, até completa solubilização.Os autores enfatizaram que os resultados obtidos através da solubilização com TMAH foram compatíveis com uma digestão ácida e não necessitaram de temperaturas altas ou ácidos fortes, sendo adequado para pequenas amostras biológicas inclusive as que contêm gordura.

3.4 VOLUMETRIA DE COMPLEXAÇÃO

Os métodos clássicos de análise química são geralmente baseados em reações químicas que ocorrem de maneira específica ou seletiva. Entre estes métodos podemos citar a volumetria de precipitação, a volumetria de neutralização, a volumetria de oxi-redução e a volumetria de complexação. A volumetria de complexação é um método cujo fundamento é a formação de complexos, que são espécies solúveis em água e são constituídas por um íon metálico (receptor de par de elétrons, ácido de Lewis) e um ou mais ligantes (espécies doadoras de elétrons, base de Lewis) (VOGEL, 1981, SKOOG, et al, 2010).

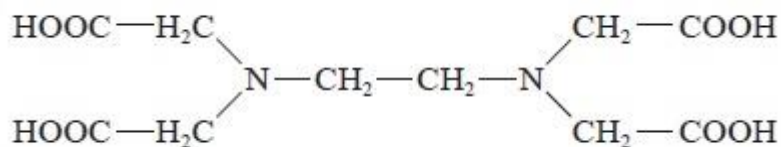
O átomo central (íon metálico) é caracterizado pelo número de coordenação, que é o número de ligações que este íon tende a formar com os doadores de elétrons, enquanto que o ligante é caracterizado pelo número de pares de elétrons que pode doar/compartilhar, monodentado (um par de elétrons), bidentado (dois pares de elétrons) e assim sucessivamente. Com isso, as reações de complexação envolvem um íon metálico M com um ligante L para a formação do complexo ML, cuja reação é representada pela equação 1 (VOGEL, 1981, SKOOG, et al, 2010).



O número de ligantes ligados a um íon metálico depende do número de coordenação do metal, do número de pares de elétrons disponíveis no ligante, além da concentração de ligante na mistura reacional. Assim, é possível existir diversos complexos de um mesmo metal e ligante. A volumetria de complexação tornou-se uma técnica notável devido a um tipo de complexo chamado de quelato, o qual apresenta elevada estabilidade química devido os ligantes englobarem o íon metálico como se fosse uma gaiola, assim o solventes não consegue entrar em contato com o metal, preservando o complexo (SKOOG, et al, 2010).

O titulante mais utilizado é o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que também pode ser encontrado sob a forma dissódica. Sua estrutura apresenta seis grupos doadores de elétrons, quatro grupos carboxílicos e dois grupos amino, portanto é um ligante hexadentado. Devido a suas características como ligante, o EDTA reage com íons metálicos na proporção de 1:1 não importando a carga do cátion, menos com metais alcalinos como o potássio e o sódio (SKOOG, et al, 2010).

Figura 2 - Fórmula estrutural do EDTA



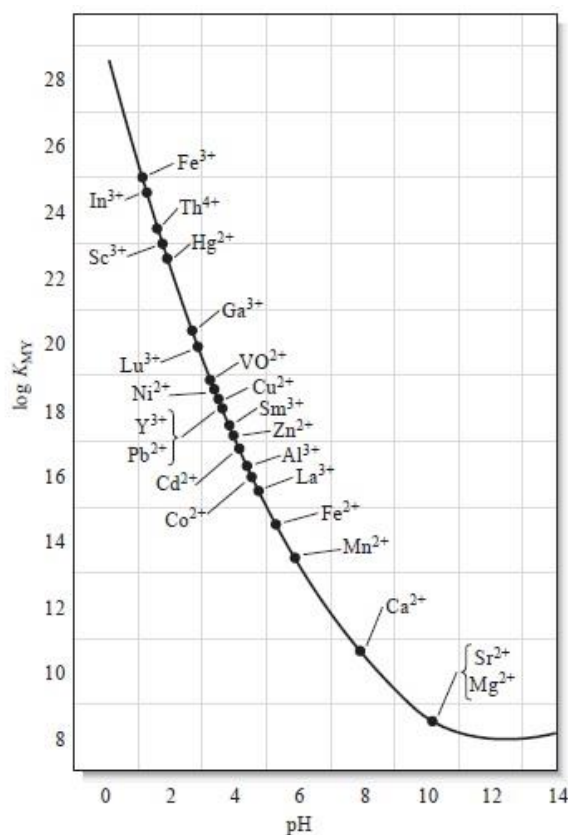
Fonte: SKOOG, et al, 2010

A aplicação analítica do EDTA não se restringe somente a volumetria de complexação, de acordo com Cienfuegos e Vaitsman (2000) ele pode ser empregado como mascarante para impedir interferências e aumentar a seletividade como reagente cromogênico nas determinações espectrofotométricas, em titulações fotométricas, na polarografia, condutimetria e titulações potenciométricas.

As reações de complexação com EDTA são realizadas em soluções tamponadas a um pH conhecido para evitar interferências por outros íons, pois para cada íon metálico existe uma condição de pH ótimo para formar complexos com o EDTA (Figura 2) o qual está relacionado a dissociação dos grupos ácidos. Além disso, cada indicador tem ação dentro de uma faixa específica de pH.

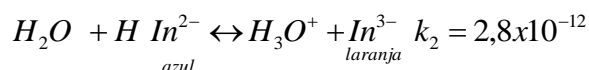
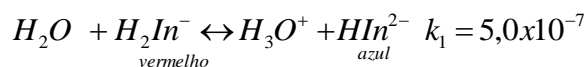
O ponto final de uma titulação qualquer pode ser determinado por meio da análise da curva de titulação ou pelo uso de um indicador. No caso de titulações complexiométricas, são usados como indicadores corantes orgânicos que formam quelatos coloridos com os íons metálicos (SKOOG, et al, 2010). O indicador mais conhecido é o Negro de Eriocromo T, que de acordo com Skoog, et al (2010) reage com íons metálicos formando complexos vermelhos. O Negro de Eriocromo T é um composto com características ácido base, que dependendo do pH fica sob uma forma dissociada específica que tem uma cor característica.

Figura 3 - pH mínimo necessário para a titulação de diversos íons metálicos com EDTA

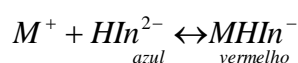


Fonte: SKOOG, et al, 2010

O indicador Negro de EriocromoT pode apresentar os seguintes equilíbrios em solução aquosa:

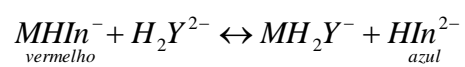


Onde H_2In^- representa o Negro de Eriocromo T, ao manter o pH próximo de 9 o indicador se encontra na forma química que tem cor azul, mas que tem que entrar em contato com íons metálicos formando complexos de cor vermelho, tal como mostrado abaixo:



Onde M^+ representa um íon metálico a ser quantificado. Ao titular a mistura com solução de EDTA, representado por H_2Y^{2-} , o íon metálico é deslocado e o indicador é liberado. Assim, o ponto de equivalência é determinado pela mudança de

cor de vermelho para azul quando é adicionado EDTA suficiente para reagir com todo o íon metálico presente na amostra, esse processo é mostrado abaixo:



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados foram vidrarias em geral, balança analítica (marca Shimadzu, modelo AUY220); chapa aquecedora; pHmetro (marca Hanna Instruments, modelo HI 2221); bloco digestor (marca Solab, modelo SL – 25/40).

4.2 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram metanol P.A, carbonato de cálcio P.A., cloreto de cálcio dihidratado P. A., ácido clorídrico P.A., hidróxido de amônio P.A., ácido nítrico P.A., peróxido de hidrogênio P.A e EDTA dissódico ambos adquiridos da Alphatec, cloreto de amônio P.A. adquirido da Vetec, hidróxido de tetrametilamônio 25% em metanol adquirido da Sigma Aldrich, hidróxido de sódio P.A. adquirido da Dinâmica, negro de eriocromo T P.A. adquirido da Impex.

As amostras de queijo utilizadas neste trabalho foram adquiridas no comércio local de Laranjeiras do Sul.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Preparo da solução padrão de cálcio 3 g L⁻¹

Foi aferida a massa de 1,8030 g de carbonato de cálcio (CaCO₃) e dissolvida com o mínimo de ácido clorídrico (HCl), o excesso de ácido e de água foi evaporado por aquecimento. O resíduo sólido resultante foi dissolvido com água destilada até o volume de 45 mL em um tubo de polipropileno. A concentração final de cálcio na solução foi de 16,06 g L⁻¹, a partir dessa solução estoque foi preparada uma solução 3 g L⁻¹ de cálcio.

4.3.2 Solução de EDTA 0,01 mol L⁻¹ 250 mL

Foi aferida a massa de 0,9301 g de EDTA e 0,025 g de cloreto de magnésio (MgCl₂) em um béquer e solubilizado com água destilada. A mistura foi transferida para um balão volumétrico e o volume completado até 250 mL com água destilada. Esta solução era preparada e padronizada diariamente.

4.3.3 Método utilizado na determinação da massa de cálcio a partir dos dados volumétricos

Na titulação de complexação é fundamental conhecer a concentração molar da solução do titulante, [EDTA], o volume do titulante, V. Com estas informações é calculado número de mol de EDTA, n, gasto na titulação de uma determinada quantidade de cálcio utilizando a equação 2.

$$[EDTA] = \frac{n}{V} \quad \text{Equação 2}$$

Como o EDTA reage na proporção 1:1 com qualquer íon metálico, concluímos que o número de mol de EDTA é o mesmo que o número de mol de cálcio. Por meio do número de mol de EDTA é o mesmo que o número de mol de cálcio, n_{Ca} , e massa molar do cálcio, M_{Ca} , é calculada a massa de cálcio titulada em gramas, por meio da equação 3.

$$n_{Ca} = \frac{m}{M_{Ca}} \quad \text{Equação 3}$$

4.3.4 Avaliação do tempo na solubilização das amostras

A amostra de queijo tipo mussarela foi fracionada em pedaços de aproximadamente 2 x 2 x 2 mm. Utilizando uma balança analítica foi aferida uma massa de 2 g da amostra em quatro diferentes tubos de polipropileno de 50 mL seguido da adição de 10 mL de água destilada e de 10 mL de TMAH 25% m/v a cada frasco, proporção de 1:5:5 de amostra, água e TMAH respectivamente. As misturas foram aquecidas a 90°C em banho-maria por diferentes períodos (30, 45, 60 e 90 min).

Após a solubilização e alcançar a temperatura ambiente as misturas foram neutralizadas com ácido clorídrico concentrado e o volume foi completado para 45 mL com água destilada.

Uma alíquota de 7 mL da amostra solubilizada foi transferida para um Erlenmeyer com 15 mL de tampão de amônio 0,25 mol L⁻¹ e 4 gotas de indicador negro de eriocromo T 0,1% (m/v).

As diferentes misturas foram tituladas em triplicata com solução padrão de EDTA 0,01 mol L⁻¹.

4.3.5 Influência do TMAH na determinação de Cálcio

Foram preparados 15 mL de soluções com diferentes concentrações de TMAH (0, 1, 2, 4, 6 e 8% m/v) previamente neutralizadas com ácido clorídrico. Nestas soluções foram adicionados 3,0 mg de cálcio sob a forma de uma solução padrão preparada com carbonato de cálcio, 5 mL de tampão de amônio 0,25 mol L⁻¹ e 2 gotas de indicador negro de eriocromo T 0,1% (m/v).

As diferentes misturas foram tituladas em triplicata com solução padrão de EDTA 0,01mol L⁻¹.

4.3.6 Influência da matriz da amostra na determinação de cálcio

Uma alíquota de 5mL de solução da amostra solubilizada foi transferida para um Erlenmeyer com 10 mL de tampão de amônio 0,25 mol L⁻¹, 3 gotas de indicador negro de eriocromo T 0,1% (m/v) e diferentes volumes de solução padrão de Ca 0,01 mol L⁻¹ (0; 3,5; 7,0 e 10,5 mL). As diferentes misturas foram tituladas em triplicata com solução padrão de EDTA 0,01mol L⁻¹.

Outro teste de adição e recuperação foi realizado variando a quantidade de amostra. Neste teste diferentes alíquotas de solução da amostra solubilizada com TMAH (0, 5, 10 e 15 mL) foi adicionada em um Erlenmeyer com 10 mL de tampão de amônio 0,25 mol L⁻¹, 2mL de solução padrão de cálcio 3 g L⁻¹, 3 gotas de indicador negro de eriocromo T 0,1% (m/v). As diferentes misturas foram tituladas em triplicata com solução padrão de EDTA 0,01mol L⁻¹.

4.3.7 Eliminação de interferências

A amostra de queijo mussarela foi solubilizada na proporção de 1:5:5 de amostra, água e TMAH 25% respectivamente. O processo de solubilização foi realizado por 60 min para uma amostra e por 120 min por outra amostra. Após a solubilização, as amostras foram fracionadas em duas partes, sendo que uma delas teve pH ajustado entre 8 e 9 com ácido clorídrico e a outra fração o pH foi ajustado entre 2 e 3 com ácido clorídrico e mantida sob agitação por 30 min.

Uma alíquota de 5mL cada solução da amostra (tratadas sob diferentes tempos e inicialmente ajustadas a diferentes pH), foi transferida para um Erlenmeyer com 15 mL de tampão de amônio 0,25 mol L⁻¹, 40 µL de indicador negro de

eriocromo T 0,1% (m/v) . As diferentes misturas foram tituladas em triplicata com solução padrão de EDTA 0,01mol L⁻¹

Após o teste de pH, foi realizado um novo teste de adição e recuperação. Foi realizado com a fração da amostra que teve pH ajustado entre 2 e 3 adicionando volumes diferentes de solução padrão de cálcio 3 g L⁻¹(0,14; 0,56 e 2 mL) foram transferidos para um Erlenmeyer com 5 mL de solução de amostra , 15 mL de tampão de amônio 0,25 mol L⁻¹, 40 µL de indicador negro de eriocromo T 0,1% (m/v) .As diferentes misturas foram tituladas em triplicata com solução padrão de EDTA 0,01 mol L⁻¹.

4.3.8 Aplicação do método desenvolvido comparandocom a digestão ácida

Para aplicação do método as amostras foram preparadas utilizando as condições previamente otimizadas. As amostras foram fracionadas em porções de aproximadamente (2 x 2x2mm). Uma massa de 2 g de cada amostra foi disposta em tubos de polipropileno de 50 mL com água e TMAH 25% na proporção de 1:5:5 (m/v/v) respectivamente. A mistura foi solubilizada a 90°C por 1 h agitando a mistura manualmente a cada 20 min. Após a solubilização, o pH foi reduzido entre 2 e 3 e o volume do frasco foi completado até 45 mL com água destilada.

Para a digestão ácida, foi medido 2 g de amostras mussarela, minas, gorgonzola e colonial e transferido para tubos de vidro borossilicato e adicionado 9,4 mL de ácido nítrico concentrado P.A e 4mL de peróxido de hidrogênio P.A. Os tubos com a mistura foram acoplados no bloco digestor mantendo sob aquecimento a 130°C por 8 hs. Após a digestão, a solução resultante foi transferida para um béquer de 100mL e aquecida em banho de areia até a evaporação total do ácido nítrico. O sólido resultante foi dissolvido com ácido clorídrico 0,1% (V/V), a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e transferida para tubo de polipropileno tendo seu volume aferido para 45 mL com água destilada.

Uma alíquota de 5 mL da solução da amostra (solubilizada com TMAH ou digerida) foi transferida para um Erlenmeyer com 15 mL de tampão de amônio 0,25 mol L⁻¹ e 40 µL de indicador negro de eriocromo T 0,1% (m/v) , em seguida a mistura foi titulada em triplicata com solução padrão de EDTA 0,01mol L⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA SOLUBILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS COM TMAH

A solubilização de qualquer soluto, envolvendo ou não uma modificação química depende de diversos fatores, entre eles podemos destacar a interação solvente- soluto, a temperatura e a relação de massa entre solvente-soluto. Como já destacado na revisão bibliográfica, o TMAH é capaz de solubilizar tecidos de origem biológicos por meio de modificações químicas que levam a formação de estruturas menores e solúveis em água, e que quanto maior a temperatura de incubação das amostras, mais eficiente e rápido é o processo de solubilização (SILVA, et al, 2012). Neste trabalho utilizaremos 90°C, que é uma temperatura suficientemente elevada para acelerar a solubilização das amostras sem danificar os frascos de polipropileno, além de que o aquecimento é realizado em banho-maria, tendo como limite a temperatura de ebulição da água que é de 100°C.

Quanto a relação de massa entre TMAH - amostra, essa é uma questão que depende da natureza da amostra. Como o processo é químico, o que rege as quantidades são as relações estequiométricas das reações que acontecem. Neste sentido sempre é utilizado uma quantidade em excesso do solvente a fim de garantir uma solubilização adequada, o que também depende do método de análise. Diversos métodos de preparo de amostras foram baseadas no uso de TMAH, de acordo com Ribeiro, et al, 2003 e Ghisi, et al, 2011, diferentes quantidades de TMAH foram utilizadas para solubilizar biodiesel, café moído e leite, mas sempre proporções inferiores 1:2 de amostra e TMAH respectivamente. Neste trabalho foi definida a proporção de 1:5 a fim de garantir reagente suficiente para a completa solubilização da amostra uma vez que o método de análise utilizado neste trabalho é mais dependente do analito estar completamente livre do que a espectrometria de absorção atômica, técnica utilizada nos trabalhos dos autores recém-citados.

Considerando as condições de temperatura e quantidade de TMAH, foi investigado o tempo necessário para a solubilização da amostra enfatizando a disponibilidade de íons cálcio. Na tabela 2 estão representadas as massas de cálcio obtidas após a diferentes tempos de incubação da amostra de queijo mussarela com TMAH.

Na avaliação visual das misturas, a amostra parece estar totalmente solubilizada a partir dos 30 min. Ao resfriar até a temperatura ambiente foi observada a formação de uma camada de gordura solidificada na parte superior da solução, indicando que as gorduras presentes na amostra não são totalmente decompostas, entretanto após leve aquecimento e homogeneização manual a mistura permanece com apenas uma fase (a olho nú), independente do tempo de incubação.

Tabela 2: Massa de cálcio recuperada na solubilização da amostra de queijo mussarela em relação ao tempo de incubação com TMAH

| Tempo (min) | Massa de cálcio obtida (mg)* |
|--------------------|-------------------------------------|
| 30 | 0,49 ± 0,08 |
| 45 | 0,51 ± 0,12 |
| 60 | 0,67 ± 0,05 |
| 90 | 0,65 ± 0,05 |

*Resultados expressos como uma média (n=3) e intervalo de confiança para 95% de confiabilidade

Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação à disponibilidade de íons cálcio, foi observado que a partir de 60 min de incubação a massa de cálcio recuperada permaneceu constante levando em conta o intervalo de confiança calculado. A fim de garantir uma solubilização mais eficiente e resultados mais confiáveis foi adotado como ideal o tempo de 60 min para a incubação das amostras. Embora a massa de cálcio recuperada tenha alcançado um patamar, isso não significa que a amostra tenha sido completamente solubilizada, mas que o cálcio tenha sido completamente extraído para a fase aquosa. Sabe-se que na verdade não ocorre uma solubilização completa da amostra, mas sim um fracionamento das partículas a ponto de formar uma suspensão estável a qual pode ser trabalhada como se fosse uma mistura homogênea.

5.2 INFLUÊNCIA DO TMAH NA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO

Na determinação do íon cálcio, é necessário que o mesmo esteja livre para que possa reagir com o agente complexante, neste caso o EDTA. Considerando uma amostra complexa como o queijo, o TMAH promove uma degradação química

das macromoléculas que o compõe, como os lipídeos, carboidratos e proteínas, processo que ocorre quando a amostra é submetida ao aquecimento na presença de deste reagente.

Todo reagente utilizado em um procedimento analítico representa um potencial interferente, principalmente se tratando de métodos clássicos de análise, onde estão envolvidas reações químicas. Assim este experimento teve como objetivo investigar se o TMAH exerce alguma influência sobre a reação de complexação entre o EDTA e o íon cálcio. Esta avaliação foi realizada medindo a quantidade de cálcio que foi recuperado em uma solução com TMAH. Foram analisadas soluções com a mesma quantidade de cálcio (3 mg), mas com diferentes concentrações de TMAH.

A massa de 3 mg de cálcio foi adotada devido estar na mesma ordem de grandeza nas amostras de queijo, após o processo de solubilização com TMAH, considerando a titulação de 5 mL da solução da amostra. Já a porcentagem de TMAH estudada foi de no máximo 8%, pois na solução a ser analisada a concentração deste reagente fica abaixo deste valor, não tendo sentido fazer essa investigação em concentrações maiores. Os dados obtidos durante o experimento estão representados na tabela 3.

A tabela 3 nos mostra que a massa de cálcio recuperada não apresentou variação na presença de TMAH, independente de sua concentração, pois todos os valores são estatisticamente iguais considerando o intervalo de confiança apresentado. Sendo assim é possível afirmar que o TMAH não exerce influência na reação de complexação entre o EDTA e o íon cálcio. Teoricamente esse resultado era esperado, pois o TMAH em soluções aquosas se apresenta dissociado sob a forma de íon tetrametilamônio e íon hidróxido os quais não tem características de ácidos Lewis, sendo que, apenas compostos com características de ácido Lewis reagiriam com o EDTA. A equação de dissociação do TMAH com a água está representada abaixo.

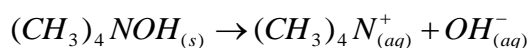


Tabela 3: Avaliação da recuperação de 3 mg de cálcio em soluções com diferentes concentrações de TMAH

| Porcentagem de TMAH (m/v) | Massa de cálcio obtida (mg)* | pH médio |
|------------------------------|---------------------------------|----------|
| 0 | 2,96 ± 0,05 | 9,4 |
| 1 | 2,97 ± 0,05 | 9,3 |
| 2 | 2,90 ± 0,04 | 9,2 |
| 4 | 2,94 ± 0,02 | 9,2 |
| 6 | 2,91 ± 0,08 | 9,3 |
| 8 | 2,78 ± 0,16 | 9,2 |

*Resultados expressos como uma média (n=3) e intervalo de confiança para 95% de confiabilidade

Fonte: Elaborado pelo autor

Neste estudo também foi monitorado o pH das misturas uma vez que o TMAH é um composto com características de base forte, o que pode influenciar o comportamento do indicador negro de eriocromo T e do EDTA nas reações de complexação, as quais são dependentes do pH. Neste procedimento o controle do pH foi realizado pela neutralização das soluções de TMAH com ácido clorídrico e posterior adição de uma solução tampão de amônio. Na tabela 3 é mostrado que independente da quantidade de TMAH o pH permaneceu praticamente constante, variando apenas na primeira casa decimal, o que não representa problemas, uma vez que na determinação de cálcio utilizando esse procedimento é necessário que o pH permaneça entre 8,0 e 11,0. Além disso, o procedimento mostra que o tampão utilizado foi efetivo.

5.3 INFLUÊNCIA DA MATRIZ DA AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO

O reagente EDTA complexa-se com íons metálicos formando quelatos suficientemente estáveis que possam ser utilizados em titulações. Para cada complexo formado há uma constante de formação a qual relaciona todas as espécies envolvidas no equilíbrio (ligante, íon metálico e complexo). Essa constantes de formação, depende do pH do meio e de outras espécies que podem promover reações paralelas, entre elas podemos destacar a protonação do EDTA e formação de complexos de cálcio com ligantes naturalmente existentes na matriz da

amostra, principalmente resíduos de proteínas, por terem átomos de nitrogênio que apresentam pares de elétrons não ligados (SKOOG, et al, 2010).

Considerando soluções aquosas de cálcio a titulação complexiométrica com EDTA é capaz de determinar quantitativamente o cálcio, entretanto na análise de uma amostra qualquer existe outras espécies químicas de caráter orgânico e inorgânico que podem influenciar negativamente a determinação deste e de outros elementos.

Com isso, a análise de amostras reais como a de queijo, é dificultada devido aos efeitos da matriz que pode conter espécies que têm propriedades químicas que podem se ligar ao analito ou ao ligante. Esses efeitos podem ser induzidos pela amostra, por reagentes e solventes empregados no preparo da solução da amostra e levam a resultados anômalos (SKOOG, et al, 2010). Uma das maneiras de avaliar a existência destas reações paralelas ou efeitos indesejados é por meio de testes onde uma quantidade conhecida de analito é adicionada sobre a amostra e posteriormente é realizada a análise a fim de verificar quanto do padrão adicionado é recuperado. Este teste pode ser realizado fazendo diferentes adições mantendo a massa de amostra constante ou fazendo apenas uma adição, mas variando o tamanho da amostra.

A tabela 4 mostra a massa de cálcio recuperada após diferentes adições de um padrão de cálcio sobre um mesmo volume de solução da amostra.

Tabela 4: Recuperação de cálcio adicionado sobre um volume fixo de amostra solubilizada com TMAH

| Volume solução padrão de cálcio (mL) | Massa de cálcio adicionada (mg) | Massa de cálcio obtida (mg)* | Porcentagem de recuperação (%) |
|---|--|---|---|
| 3,5 | 2,78 | 2,16± 0,04 | 77 |
| 7,0 | 4,18 | 3,05± 0,15 | 72 |
| 10,5 | 5,58 | 3,89± 0,04 | 70 |

*Resultados expressos como uma média (n=3) e intervalo de confiança para 95% de confiabilidade

Fonte: Elaborado pelo autor

A tabela 4 nos mostra que a recuperação de cálcio foi de no máximo 77%, indicando que parte do cálcio não é complexado com o EDTA como se o cálcio não estivesse na solução, pois o limite aceitável de recuperação é entre 80 e 120%. Isso

ocorre quando o analito forma um complexo mais estável com outra espécie presente na mistura, ou quando é precipitado. Estes resultados indicam que existem interferências, as quais devem ser identificadas e buscar estratégias para minimizá-las. Também foi observado que a porcentagem de recuperação é constante, indicando que a massa de cálcio recuperada aumenta proporcionalmente a massa total adicionada de maneira que a quantidade relativa seja aproximadamente a mesma.

Na tabela 5 são mostrados os resultados de recuperação de cálcio considerando a massa de cálcio adicionada constante e variando o tamanho da amostra.

Tabela 5: Recuperação de cálcio adicionado (0,8 mg) sobre diferentes volumes de amostra solubilizada com TMAH

| Volume solução de amostra (mL) | Massa de cálcio esperada (mg) | Massa de cálcio obtida (mg) | Porcentagem de recuperação (%) |
|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 0 | 0,80 | 0,80 | - |
| 5 | - | 1,00± 0 | - |
| 10 | 1,2 | 1,60 ± 0 | 133 |
| 15 | 1,4 | 2,60 ± 0 | 185 |

*Resultados expressos como uma média (n=3) e intervalo de confiança para 95% de confiabilidade

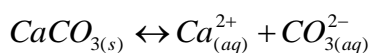
Fonte: Elaborado pelo autor

Ao adicionar 5mL de solução de amostra sobre uma solução padrão contendo 0,8 mg de cálcio e esta analisada, foi obtido 1,00 mg de cálcio, logo concluímos que em 5 mL de solução de amostra tem 0,20 mg de cálcio. Assim, ao adicionar 10 mL de solução de amostra mais a massa fixa de cálcio (0,8 mg) era esperado recuperar 1,2 mg, porém houve uma recuperação de 1,6 mg, já para 15 mL eram esperados 1,4 mg, mas foi recuperado 2,6 mg. Com estes resultados concluímos que existe mais do que 0,2 mg de cálcio em 5 mL de solução da amostra, mas que não está livre em solução para reagir com o EDTA. Estas observações vem no sentido de reforçar o que foi comprovado no teste anterior, que existem interferências.

Imaginando que parte do cálcio esteja indisponível, as primeiras suposições são de que o cálcio esteja precipitado. Devido as características da amostra e do

meio em que ela se encontra, o cálcio pode estar precipitado sob a forma de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), ou sob a forma de carbonato de cálcio (CaCO_3). A segunda suposição está relacionada a presença de carbonatos solúveis existentes no queijo, que ao entrar em contato com o cálcio precipitam, uma vez que o produto de solubilidade do carbonato de cálcio é muito baixo ($4,5 \times 10^{-9}$) (SKOOG, et al, 2010).

Considerando apenas o cálcio adicionado sobre a amostra (0,8 mg), esta massa corresponde a 2×10^{-5} mol de cálcio. O volume da mistura titulada (5mL amostra, 15 mL solução tampão) corresponde a 0,02 L, assim a concentração molar de cálcio na mistura é de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O equilíbrio de dissociação do carbonato de cálcio é mostrado abaixo.

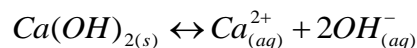


Substituindo o valor do Kps e da concentração molar de cálcio na expressão da lei de ação de massas é calculada a concentração de carbonato que é de $4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

$$\begin{aligned} K_{ps} &= [\text{Ca}^{2+}] [\text{CO}_3^{2-}] \\ 4,5 \times 10^{-9} &= 10^{-3} [\text{CO}_3^{2-}] \\ [\text{CO}_3^{2-}] &= 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \end{aligned}$$

Isso significa que, para iniciar a precipitação do carbonato de cálcio é necessária uma concentração mínima de carbonato equivalente a $4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Não foi executada nenhuma análise do queijo quanto ao teor de carbonatos, mas observamos que o cálcio facilmente precipitaria, pois a quantidade de carbonato necessária para que tal processo ocorra é muito baixa. Estando precipitado o cálcio, não estaria disponível para reagir com o EDTA ou a reação ocorreria que maneira muito lenta o que dificultaria a identificação do ponto final.

Agora considerando a formação do hidróxido de cálcio, cujo produto de solubilidade é de $6,5 \times 10^{-6}$ (SKOOG, et al, 2010), temos a mesma concentração de cálcio ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). O pH da solução da amostra após a solubilização é de aproximadamente 13, assim a concentração de íons hidróxido na mistura é de $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Substituindo o valor do Kps e da concentração molar de cálcio na expressão da lei de ação de massas é calculada a concentração de hidróxido que é de $8,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.



$$K_{ps} = [Ca^{2+}][OH^{-}]^2$$

$$6,5 \times 10^{-6} = 10^{-1} [OH^{-}]^2$$

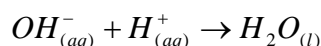
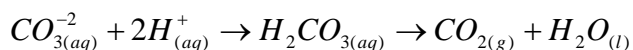
$$[OH^{-}] = 8,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

Este resultado mostra que a concentração mínima de hidróxido para iniciar a precipitação é de $8,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, entretanto a concentração deste íon na mistura é maior ($10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$), ou seja, existem condições para o cálcio precipitar, o que levaria a erros de análise. Destacamos que estes cálculos são aproximados, pois a concentração de cálcio na mistura é maior devido a contribuição do cálcio do queijo, o que não foi contabilizado, além de que, para obtermos resultados mais precisos seria necessário levar em conta a atividades de cada espécie envolvida no equilíbrio e não a concentração molar.

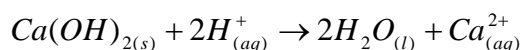
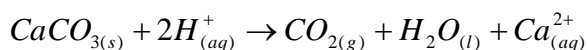
Além da suposição sobre a precipitação do cálcio, ainda existe a possibilidade de alguma espécie química presente na amostra estar complexando o cálcio com maior efetividade que o EDTA. Este possível interferente é mais difícil de ser eliminado ou identificado, mas considerando a elevada reatividade do TMAH, uma das maneiras de diminuir esta possível interferência seria incubar a amostras por um período maior visando à decomposição deste interferente.

5.4 ELIMINAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS

Pelo exposto acima é provável que íon hidróxido e carbonato sejam responsáveis pelas possíveis interferências. O efeito destes interferentes é facilmente minimizado pela acidificação das soluções, onde o carbonato é decomposto a dióxido de carbono e água, enquanto que íons hidróxido são convertidos em água.



Se for considerado o cálcio já precipitado, a acidificação das soluções promoveria a liberação do cálcio, tal como mostrado pelas equações abaixo.



A tabela 6 mostra os resultados obtidos através da análise do queijo solubilizado e analisado sob quatro diferentes condições com a intenção de identificar e minimizar as interferências desta análise.

Tabela 6: Massa de cálcio recuperada em relação aos diferentes tempos e diferentes pH

| Tempo (h) | pH 8-9* | pH 2-3* |
|------------------|----------------|----------------|
| 1 | 0,23 ± 0,05 | 0,43 ± 0,03 |
| 2 | 0,21 ± 0,02 | 0,43 ± 0,03 |

*Resultados expressos como uma média (n=3) e intervalo de confiança para 95% de confiabilidade

Fonte: Elaborado pelo autor

Ao comparar os resultados considerando os diferentes tempos de incubação das amostras com TMAH percebe-se que não houve diferença entre uma ou duas horas de incubação, este resultado já era esperado, pois algo semelhante já foi mostrado na tabela 3. O resultado obtido nos mostra que se existisse alguma espécie com potencial para reagir com o cálcio e que pudesse ser decomposta pelo TMAH, ocorreria um aumento da massa de cálcio obtida, entretanto a massa não variou, comprovando que este tipo de interferência não foi identificado. Assim, a fim que aumentar a frequência analítica é preferível preparar a amostra com uma hora de incubação.

Considerando o mesmo tempo de incubação, mas com pH ajustado entre 8 – 9 ou 2 – 3 percebemos que houve um aumento médio de 96% na recuperação de cálcio na solução ácida em relação a solução alcalina. Essa observação está de acordo com o exposto acima, onde o cálcio poderia estar precipitado sob a forma de carbonato de cálcio ou de hidróxido de cálcio e assim não reagiria, ou reagiria de forma lenta com o EDTA o que compromete os resultados.

Estes testes em que a redução de pH resultou em recuperações satisfatórias foram acompanhados de homogeneização da mistura acidificada por 30 min. Também foram realizados testes onde após a acidificação, a amostra foi imediatamente analisada sem a homogeneização. Estes testes revelaram que as recuperações com ou sem este período de homogeneização é igual, assim, a fim estabelecer um procedimento mais rápido, as análises a partir deste momento foram realizadas imediatamente após a acidificação das soluções.

Definindo a metodologia em relação ao pH a ser utilizado, realizou-se novamente um teste de adição e recuperação com solução padrão de cálcio (tabela 7).

Tabela 7: Recuperação de cálcio adicionado sobre um mesmo volume fixo de amostra solubilizada com TMAH e pH ajustado entre 2-3

| Massa de cálcio adicionada (mg) | Massa de cálcio recuperada (mg)* | Recuperação (%) |
|--|---|------------------------|
| 0,42 | 0,44 ± 0,01 | 105 |
| 1,68 | 1,57 ± 0,01 | 93 |
| 6,0 | 6,17 ± 0,06 | 103 |

*Resultados expressos como uma média (n=3) e intervalo de confiança para 95% de confiabilidade

Fonte: Elaborado pelo autor

Através da Tabela 7 foi possível verificar que houve uma porcentagem de recuperação satisfatória, ficando entre 93 e 105%. Esses resultados demonstram que o íon cálcio adicionado permanece livre sem se ligar aos componentes presentes na solução da amostra e conseqüentemente, a metodologia utilizada é eficiente na determinação de cálcio nas amostras de queijo.

5.5 APLICAÇÃO MÉTODO PROPOSTO E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO PADRÃO DE PREPARO DE AMOSTRA

Após o estabelecimento da condição mais adequada para a determinação de cálcio nas amostras solubilizadas com TMAH o método foi aplicado na análise de diferentes amostras e submetido à comparação com os resultados obtidos da análise das amostras digeridas por via úmida. Estes resultados estão expressos na tabela 8.

Tabela 8: Concentração de cálcio em diferentes amostras de queijo (mg de cálcio por Kg de amostra) obtidos pela análise após diferentes procedimentos de preparo de amostra

| Tipo de queijo | Solubilização da amostra com TMAH | Digestão ácida | Recuperação (%) |
|-----------------------|--|-----------------------|------------------------|
| Mussarela | 9385 ± 504 | 10485 ± 806 | 89 |
| Minas | 7248 ± 2193 | 8673 ± 1610 | 84 |
| Gorgonzola | 5210 ± 1943 | 6103 ± 2340 | 85 |
| Colonial | 6601 ± 758 | 8370 ± 1398 | 79 |

*Resultados expressos como uma média (n=3) e intervalo de confiança para 95% de confiabilidade

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados revelam que a quantidade de cálcio obtida pelos dois métodos é semelhante, sendo um pouco menor nos resultados obtidos após a solubilização com TMAH. Essa leve diferença se deve a interferências que nunca serão eliminadas, mas apenas minimizadas a ponto de não distorcem os resultados (SKOOG, et al, 2010). Considerando que a digestão ácida é o método padrão, as recuperações com o método proposta ficaram entre 79 e 89%, sendo aceitáveis valores entre 80 e 120% no desenvolvimento de um método analítico. Isso nos leva a considerar que o método proposto é eficiente para a determinação de cálcio neste tipo de amostra. Também observamos que ainda é necessário otimizar o processo de maneira a aumentar as recuperações e diminuir os intervalos de confiança que neste caso são elevados.

Com relação aos dois métodos avaliados foram determinadas as figuras de mérito (Tabela 9) para cada um deles. O desvio padrão relativo (RSD) representa uma medida da precisão do método, geralmente obtida pela análise de cinco réplicas da mesma amostra preparadas de maneira independente. Outro parâmetro de mérito avaliado foi o limite de detecção (LOD), o qual se refere à mínima quantidade do analito que pode ser detectada pelo método, o qual é determinado como sendo três vezes o desvio padrão (considerando a diluição da amostra) de dez réplicas de um branco constituído da matriz da amostra ou da amostra estudada com menor concentração do analito. Para a obtenção destes parâmetros foi utilizada

a amostra de queijo tipo gorgonzola por apresentar menor quantidade de cálcio. As figuras de mérito obtidas estão mostradas na tabela 9.

Tabela 9: Figuras de mérito

| | Método proposto | Digestão ácida |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Limite de detecção, LOD (mg/kg) | 240 | 180 |
| Desvio padrão relativo, RSD (%) | 3,5 | 2,7 |

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados nos mostram que o limite de detecção dos dois métodos está na mesma ordem de grandeza, 240 e 180 mg kg⁻¹ para o método proposto e digestão ácida respectivamente. Estes valores são ao menos 100 vezes maiores do que os obtidos por espectrometria de absorção / emissão atômica ou espectrometria de massa com plasma, as quais são as técnicas de referência para análise inorgânica (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009). Mesmo sendo elevado, o LOD é suficientemente baixo para que o cálcio seja mensurado com segurança neste tipo de amostra. Quanto ao RSD os valores obtidos são inferiores a 4% mostrando que o método possui alta precisão.

6 CONCLUSÃO

O tempo necessário para uma solubilização eficiente do queijo com TMAH foi de uma hora, tempo muito inferior ao necessário para realizar a digestão via úmida (em frascos abertos) que foi de no mínimo oito horas, sendo este tempo reduzido para a solubilização suficiente para a solução obtida estar homogênea e a recuperação de cálcio constante demonstrando ser um método rápido e eficiente. Esse método também demonstrou possuir vantagens ao utilizar menor quantidade de reagentes, gerando conseqüentemente menos resíduos, e a possibilidade de utilizar equipamentos mais simples como uma chapa aquecedora. Foi também observado que o TMAH não interferiu na reação de complexação, porém, a condição alcalina supostamente causa precipitação do cálcio, o que interfere na análise. A solução para esta interferência foi a redução de pH para 2-3 logo após a solubilização das amostras. Ao aplicar o método proposto e otimizado houve uma recuperação de 79 a 89%, o que é adequado, pois está dentro dos limites aceitáveis. O método proposto apresentou limite de detecção de 240 mg Kg^{-1} que é satisfatório para este elemento neste tipo de amostra, além de boa precisão podendo até ser substituído de um método instrumental.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996

BRASIL, R.B. **Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino.** Universidade Federal de Goiás – Escola de Veterinária e Zootecnia. Goiânia, 2013

CIENFUEGOS, F., VAITSMAN, D. **Análise Instrumental.** Rio De Janeiro- RJ: Interciência, 2000

COBAYASHI, F. **Cálcio: Seu papel na nutrição e saúde.** Compacta Nutrição, Vol. V – nº2, São Paulo- SP, 2004

GONDIM, J.A.M., MOURA, M.F., DANTAS, A.S., MEDEIROS, R.L.S., SANTOS, K.M. **Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas.** Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(4):825-827, out-dez.2005

HOLLER, F.A.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de análise instrumental.** 6ª edição – Porto Alegre-RS : Bookman,2009

KRUG, F. A. **Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar.** 1ª edição – Piracicaba- SP, 2008

NÓBREGA, J.A; SANTOS, M.C.; SOUSA, R.A.; CADORE, S.; BARNES, R.M.; TATRO, M. **Sample preparation in alkaline media.** Spectrochimica Acta Part B 61 (2006) 465- 495

NUNES, A.M. ACUNHA, T.S.; ORESTE, E.Q.;LEPRI, F.G.;VIEIRA, M.A.;CURTIUS,A.J.;RIBEIRO, A.S. **Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in fresh and processed meat treated with tetramethylammonium hydroxide by atomic absorption spectrometry.** J. Braz. Chem. Soc. Vol 22 no 10 São Paulo - SP Oct 2011

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal.** Vol2 . Porto Alegre: Artmed, 2005

PEREIRA, J.B.F. **Partição de cálcio em queijo minas padrão e sua bioacessibilidade ao longo do tempo de maturação.** Universidade Federal de Juiz de Fora – Programa de Pós-graduação em ciências e tecnologia do leite e derivados. Juiz de Fora, 2014

PEREIRA, L. A.; WINDMOLLER,C.C.;SILVA, B.B., NETO, W.B. **Solubilização alcalina de peixes e otimização multivariada para determinação de chumbo e manganês usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.** Química Nova vol.34 no. 7 São Paulo 2011

RIBEIRO, A.S.; MORETTO, A.L.; ARRUDA, M.A.Z.; CADORE, S. **Analysis of Powdered Coffe and Milk by ICP OES after sample treatment with Tetramethylammonium Hydroxide.** Microchim. Acta 141, 149-155 (2003)

SAVIO, M.; ORTIZ,M.S.;ALMEIDA,C.A.;OLSINA,R.A.;MARTINEZ,L.D.;GIL,R.A. **Multielemental analysis in vegetable oils by inductively coupled plasma mass spectrometry after solubilisation with tetramethylammonium hydroxide.** FoodChemistry 159 pag 433-438, 2014

SILVA, C.;NUNES,A.M.;ORESTE, E.Q.;ACUNHA, T.S.;VIEIRA, M.A.; RIBEIRO, A.S. **Evaluation of sample preparation methods based on alkaline and acid solubilization for the determination of Na and K in meat samples by atomic spectrometric techniques.**J. Braz.Chem. Soc. Vol. 23 no 9 São Paulo Sept 2012

SKOOG, D.A.; *et al.* **Fundamentos de Química Analítica.** 8ª edição – São Paulo: Cengage Learning, 2010

VOGEL, A.I. **Química Analítica Qualitativa.**5ª ed. Ver. – São Paulo: Mestre Jou, 1981

WU, Y;LEE, Y; WU,L; HOU,X. **Simple Mercury speciation analysis by CVG-ICP-MS following TMAH pre-treatment and microwave-assisted digestion.** MicrochemicalJournal 103 (2012) 105-109